







دانشگاه علوم پزشکی و خدمات  
بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکترای حرفه ای (پزشکی)

عنوان پایان نامه:

بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه ترخون روی سلول های رده MCF-7 سرطان پستان

استاد راهنما:

آقای دکتر حسین پیری

استاد مشاور:

آقای دکتر حسن جهانی هاشمی

نگارش:

دکتر حمیدرضا شاهراه نجیب

سال تحصیلی:

۹۵-۹۶

تاریخ دفاع:

۱۳۹۵/۱۲/۲۵





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

شماره ثبت: ۱۱۱۰۵

**عنوان :** بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه ترخون روی سلول های رده MCF-7 سرطان پستان

استاد راهنما : آقای دکتر حسین پیری

استاد مشاور: آقای دکتر حسن جهانی هاشمی

پژوهش و نگارش : دکتر حمید رضا شاهراه نجیب

### چکیده :

**مقدمه :** سرطان سینه شایعترین سرطان در بین زنان است و در سال های اخیر در ایران روند رو به رشدی داشته است . درمان های شیمیایی موجود سرطان عوارض زیادی داشته و استفاده از گیاهان دارویی یکی از مفیدترین راه هاست که کمترین عوارض جانبی را ایجاد میکند . گیاه ترخون از خانواده Artemisia با توجه به مقادیر بالای ترکیبات آنتی اکسیدانی منبع مناسبی برای استفاده دارویی جهت درمان و جلوگیری از پیشرفت سرطان هاست.

**مواد و روش ها :** پس از جمع آوری نمونه ها عصاره اتانولی تهیه شد. سلول های سرطانی MCF-7 در غلظت های مختلف از عصاره برای ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شد. اثر مهاری عصاره با استفاده از روش های MTT و تریپان بلو بررسی شد تمام داده ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA و به دنبال آن آزمون تعقیبی TUKEY آنالیز شد. در تمام آنالیز ها  $P < 0.05$  معنی دار تلقی گردید.

**نتایج و یافته ها:** در تست های MTT و تریپان بلو با افزایش غلظت و زمان میزان آپوپتوز سلولی افزایش پیدا کرد. عصاره اتانولی ترخون علیه سلول های رده MCF-7 سرطان پستان فعالیت ضد سرطانی دارد.

**کلمات کلیدی:** ترخون ، سلول های رده MCF-7 ، سرطان پستان



تقدیم به:

تشکر و قدر دانی از

## فهرست مطالب

عنوان

صفحه

۱۱	فصل اول: کلیات
۱۳	۱-۱- بیان مسئله :
۱۴	۲-۱- مقدمه و اهمیت موضوع:
۱۶	۳-۱- کلیات :
۱۷	۴-۱- سرطان سینه :
۱۸	۱-۴-۱- شیوع سرطان سینه در ایران :
۱۹	جدول ۱-۱ - تغییرات میزان بروز سرطان ها در زنان ایرانی از سال ۱۹۶۵ تا ۱۹۹۸ میلادی
۱۹	۲-۴-۱- نقش استروژن در سرطان سینه :
۲۰	۵-۱- سلول های MCF-7 :
۲۱	۱-۵-۱- مشخصات و ویژگی های MCF-7 :
۲۱	جدول ۲-۱ - مشخصات و ویژگی های MCF-7 :
۲۲	۶-۱- سرده ARTEMISIA :
۲۳	۱-۶-۱- ترکیبات آنتی اکسیدانی :
۲۴	جدول ۳-۱ - ترکیبات فنولی ARTEMISIA ANNUA
۲۵	۲-۶-۱- فلاوونوئیدها :
۲۵	۱-۲-۶-۱- ویژگی های ضد سرطان فلاوونوئیدها :
۲۶	۳-۶-۱- ترخون گونه دیگری از سرده ARTEMISIA :
۲۶	۱-۳-۶-۱- ریخت شناسی گیاه :



- ۲۷ ۱-۶-۳-۲- دامنه انتشار :
- ۲۷ ۱-۶-۳-۳- ترکیبات فعال از نظر بیولوژیک :
- ۲۸ جدول ۱-۴- ترکیبات فعال از نظر بیولوژیکی ترخون
- ۳۰ شکل ۱-۱- ساختار ترکیبات بیواکتیو ترخون
- ۳۱ ۱-۶-۳-۴- ویژگی های گیاه از نظر داروسازی و فعالیت بیولوژیکی :
- ۳۲ ۱-۶-۳-۵- فعالیت دارویی ترخون در محیط IN VIVO :
- ۳۶ ۱-۶-۳-۶- عصاره ترخون :

### ۳۷ فصل دوم: بررسی متون

---

### ۴۵ فصل سوم: مواد و روش ها

---

- ۴۷ روش اجرا و طراحی تحقیق
- ۴۷ ۳-۱- آماده سازی عصاره اتانولی گیاه :
- ۴۸ ۳-۲- بررسی اثر ضد سرطانی عصاره ها :
- ۴۸ ۳-۳- سنجش توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو:
- ۴۹ ۳-۴- سنجش تترازولیوم (MTT) :
- ۵۰ ۳-۵- جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:
- ۵۱ ۳-۶- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها :

### ۵۳ فصل چهارم: یافته ها و نتایج

---

- ۱-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار ۲۴ ساعته عصاره گیاه ترخون:
- ۵۵

جدول ۴-۱- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره گیاه ترخون

۴-۲- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه ترخون: ۵۶  
جدول ۴-۲- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه ترخون ۵۷  
۴-۳- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۲۴ ساعته عصاره گیاه ترخون: ۵۸

جدول ۴-۳- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره گیاه ترخون ۵۸

۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶ ساعته عصاره گیاه ترخون: ۵۹

جدول ۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶ ساعته عصاره گیاه ترخون ۶۰

## فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۶۱

- ۵-۱- بحث مربوط به تغییرات غلظت در تاثیر عصاره گیاه ترخون بر سلول های سرطانی MCF-7 : ۶۳  
۵-۲- بحث مربوط به تغییرات زمان در تاثیر عصاره گیاه ترخون بر سلول های سرطانی MCF-7 : ۶۳  
۵-۳- نتیجه گیری کلی: ۶۴  
۵-۴- پیشنهادات: ۶۴

## فصل ششم: منابع ۶۷

- ۶-۱- منابع فارسی : ۶۹  
۶-۲- منابع انگلیسی : ۶۹

# **فصل اول:**

## **کلیات**



## ۱-۱- بیان مسئله :

در سال های اخیر بشر متوجه عوارض نامطلوب بسیاری از داروهای صناعی شده که نه تنها بر روی خود بیمار اثر نامطلوب گذاشته اند بلکه می توانند بر روی نسل های بعدی نیز اثر بد داشته باشند . بدین جهت توجه و نگرشی جدید نسبت به استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کمتر ایجاد شده است . همچنین مطالعه بر روی داروهای کنونی نشان می دهد که اگر چه گیاهان دارویی از لحاظ میزان ، سهم کم تری را در تهیه داروها دارا هستند ولی در عوض داروهای حیاتی همچون داروهای حاصل از تریاک ، بلادون ، فیزوستیگما ، وینبلاستین و تعدادی دیگر از داروهای ضد سرطان موثر از گیاهان تهیه می شوند . استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها یکی از مفید ترین راه ها بوده است که کم ترین اثرات جانبی را ایجاد می کند.

## ۱-۲- مقدمه و اهمیت موضوع:

سرطان بیماری است که از تکثیر غیر طبیعی سلول های بدن ناشی می شود . بدن انسان از میلیون ها سلولی ساخته شده است که با یکدیگر گروه بندی شده تا بافت ها و اندام های مختلف را بسازند . ژن های داخل هر سلول به آن دستورهای لازم را صادر می کنند . گاهی اوقات این دستورات در یک سلول مبهم و مغشوش بوده و سلول رفتار غیر طبیعی دارد و پس از مدتی گروهی از سلول های غیر طبیعی می توانند در خون یا سیستم ایمنی گردش کرده یا تبدیل به توده یا تومور بدخیم یا سرطان شوند . در واقع سلول های بدن در طی یک روند تنظیم یافته از بین میروند و سلول های جدید جای آنها را می گیرند گاهی اوقات این روند طبیعی از تنظیم خارج شده و سلول های فرسوده از بین نمی روند و تشکیل توده ای را می نمایند که می توانند تبدیل به تومور بدخیم یا سرطان شوند.

بیش از دویست نوع متفاوت از بیماری سرطان وجود دارد که هر کدام به شیوه های خاص ایجاد می شوند . چیزی که در همه آنها مشترک است این است که همه آنها به روشی مشابه شروع می شوند که تغییر در ساختار طبیعی یک سلول است . تقسیم سلول های غیر طبیعی تحت کنترل نیستند و معلوم نیست که چه زمانی متوقف می شود . یک دسته از سلولهای غیر طبیعی یک تومور نامیده می شود. همه تومورها سرطان نیستند دوتنوع تومور وجود دارد ؛ خوش خیم و بد خیم . تومورهای خوش خیم سرطان نیستند . تومورهای بد خیم همان سرطان ها هستند و می توانند به قسمت های مجاور بدن حمله کنند و مانع فعالیت سلول های سالم آن منطقه شوند . در عین حال سلول های تومورهای بدخیم می توانند گسترش یافته و به نقاط دیگر بدن دست اندازی کنند و در

مکانی دور از محل اولیه تجمعاتی از سلول های غیر طبیعی را ایجاد کنند . این مرحله را متاستاز می نامند . در سال ۲۰۰۵ ، در دنیا ۷/۶ میلیون نفر جان خود را به دلیل ابتلا به سرطان از دست داده اند. در سال ۲۰۲۰، شانزده میلیون نفر به سرطان مبتلا می شوند و در همین زمان ، سالانه ده میلیون نفر از این بیماری می میرند . در ده سال آینده در صورتی که اقدامی صورت نگیرد هشتاد و پنج میلیون نفر به دلیل سرطان خواهند مرد . بیش از ۷۰٪ موارد مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای دارای درآمد پایین یا متوسط است . اما مشکل واقعی سرطان بیش تر از این اعداد است چرا که یک سوم بیماران دچار افسردگی و اضطراب در حد بالینی هستند و همچنین به دلیل از دست رفتن درآمد و لزوم تامین مخارج درمان ، آسیب شدیدی به عملکرد اقتصادی خانواده وارد می شود . با این حال ، از سرطان می توان رهایی جست زیرا بیش از ۴۰٪ موارد سرطان قابل پیشگیری هستند و ثلث دیگر بیماران در صورت تشخیص به موقع قابل درمان قطعی می باشند . در بقیه بیماران نیز که غیر قابل درمان هستند ، انجام درمان های حمایتی به بهبود کیفیت زندگی بیماران کمک اساسی خواهد نمود . در آخرین آمار در کشورمان ، سرطان با ۹/۴٪ بعد از گروه بیماریهای دستگاه گردش خون ( ۳۳/۴٪ ) و سوانح مسمومیت و خودکشی ( ۱۳/۴٪ ) به عنوان سومین علت مرگ مطرح گردیده است. در هر سال در کشور حدود صد هزار مورد جدید سرطان بروز می نماید . تفاوت بارزی در نحوه بروز سرطان و الگوی انتشار آن در مناطق مختلف جغرافیایی کشور مشاهده شده است . در برنامه ریزی ملی مبارزه با سرطان ، تحقیقات سرطان دارای نقش اساسی و محوری است . با توجه به هزینه زیاد درمان سرطان در مراحل پیشرفته بیماری ، سرمایه گذاری در امر تحقیقات سرطان از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است [1] .

### ۱-۳- کلیات :

در سال های اخیر بشر متوجه عوارض نامطلوب بسیاری از داروهای صناعی شده که نه تنها بر روی خود بیمار اثر نامطلوب گذاشته اند بلکه می توانند بر روی نسل های بعدی نیز اثر بدی داشته باشند. همچنین به دلیل علاقه مردم به داروهای گیاهی توجه و نگرشی جدید نسبت به استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کمتر ایجاد شده است. مطالعه بر روی داروهای کنونی نشان می دهد که اگر چه گیاهان دارویی از لحاظ میزان سهم کمتری را در تهیه داروها دارا هستند در عوض داروهای حیاتی همچون داروهای حاصل از تریاک , بلادون , فیزوستیگما , وینبلاستین و تعداد دیگری از داروهای ضد سرطان موثر از گیاهان تهیه می شوند . استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها یکی از مفید ترین راه ها بوده است که کم ترین اثرات جانبی را ایجاد می کند . یکی از سرده های گیاهی که امروزه به دلیل خواص بی شمار آن توجه بسیاری را به خود جلب کرده است و تحقیقات زیادی بر روی آن انجام می گیرد سرده *Artemisia* می باشد و گونه های این سرده در حال حاضر یکی از پر مصرف ترین گیاهان دارویی در سراسر جهان می باشند . به عنوان مثال *Artemisia annua* یکی از ۴ گیاه دارویی با بالاترین میزان ظرفیت جذب رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد . گیاه ترخون یا همان *Tarragon* با نام علمی *Artemisia drucunculus* بعنوان یکی از گونه های مهم این سرده و با توجه به در دسترس بودن آن در تمام نقاط ایران و پیشینه آن در استفاده به عنوان گیاه دارویی به عنوان هدف این تحقیق قرار گرفته است .



#### ۱-۴- سرطان سینه :

سرطان سینه بیشترین سرطانی است که در دنیا تشخیص داده می شود ، چیزی در حدود یک میلیون مورد جدید در هر سال در کل دنیا [1] . همچنین دلیل اصلی مرگ زنان در اثر سرطان در کل دنیا محسوب می شود. در ایالات متحده امریکا بیشترین سرطان در زنان و دومین علت مرگ زنان در اثر سرطان و دلیل اصلی مرگ زنان در سنین بین ۲۰ تا ۵۹ سال است [2] .

در سال ۲۰۰۸ در کل دنیا بیس از ۱,۳۸۴,۰۰۰ مورد جدید سرطان سینه تشخیص داده شد [1] . بیشترین میزان شیوع موارد جدید در امریکای شمالی ، استرالیا ، نیوزلند و غرب و شمال اروپا و کمترین میزان آن در آسیا و مناطق زیر صحرای افریقا [3,4] . احتمالا این تفاوت در بین کشورها و مناطق مختلف با تغییرات جوامع که ناشی از صنعتی شدن کشورهاست ( مثل افزایش مصرف غذاهای چرب ، میانگین وزن ، تغییر سن اولین قاعدگی و یا شیردهی ، تغییر الگوی تولید مثل مانند بارداری های کمتر و سن بالاتر اولین بارداری ) در ارتباط می باشد . مطالعات الگوی مهاجرت به ایالات متحده امریکا بر پایه ی اهمیت فرهنگ و تغییرات محیطی بنا شده است [4] .

در این مطالعات در کل بروز سرطان سینه در نسل دوم مهاجرین بیشتر می شود و حتی این میزان در نسل های سوم و چهارم بیشتر هم می شود [4] . در ایالات متحده امریکا ، موارد جدید سرطان سینه بیش از ۲۳۰,۰۰۰ مورد در هر سال برآورد می شود که مسئول بیش از ۴۰,۰۰۰ فوت در سال است [2] . این میزان از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۷ در حدود ۱/۸٪ کاهش داشته [5] ، که دو فاکتور در این امر دخیل بوده اند :

۱ - توقف هورمون درمانی (HRT)

۲ - افزایش انجام ماموگرافی و غربالگری [6-9]

از این رو احتمالاً ، توقف هورمون درمانی اثر بیشتری دارد [8,10,11] .

#### ۱-۴-۱- شیوع سرطان سینه در ایران :

سرطان سینه شایع ترین سرطان در میان زنان ایرانی است (جدول ۱-۱) [12] . سرطان سینه در ایران نسبت به کشورهای توسعه یافته ، حداقل ۱۰ سال زودتر زندگی زنان را تحت تاثیر قرار می دهد [13] . نرخ مرگ ناشی از سرطان سینه در سال ۱۹۹۸ در تهران ۵/۸ در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر [14] و در سال ۲۰۰۱ ، ۲/۵ نفر در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر و به طور کلی مسئول ۷۷۶۲ سال ، زندگی از دست رفته (بر اساس سن امید به زندگی در ایران) در ۱۸ استان ایران بوده است [15] . کشورهای در حال توسعه امیدوارند که بتوانند سرطان سینه را به عنوان یک تهدید کننده ی جدی حیات جامعه کنترل کنند [16] .

جدول ۱-۱ - تغییرات میزان بروز سرطان ها در زنان ایرانی از سال ۱۹۶۵ تا ۱۹۹۸ میلادی

نوع سرطان	درصد از کل سرطان ها در سال ۱۹۶۵	درصد از کل سرطان ها در سال ۱۹۹۸
Cervix	٪ ۱۹/۷	٪ ۵/۵
Breast	٪ ۱۲/۶	٪ ۲۵/۳
Esophagus	٪ ۶/۲	٪ ۳/۹
Lymphoma	٪ ۴/۲	٪ ۳/۲
Corpus Uteri	٪ ۳/۲	٪ ۲/۲

سرطان سینه ، مسئول ۲۵/۳ درصد از تمام سرطان های زنان در سال ۱۹۹۸ در تهران بوده است [17] . بنیاد ملی سرطان گزارش داده که در سال ۲۰۰۰ ، ۱۶۰۳ مورد جدید و در سال ۲۰۰۳ ، ۳۹۴۶ مورد جدید و در سال ۲۰۰۴ ، ۴۵۵۷ مورد جدید از سرطان سینه داشته ایم و این روند صعودی همچنان ادامه دارد [12] .

در مطالعه ای در سال ۲۰۰۷ توسط موسوی و همکاران ، روی اپیدمیولوژی سرطان سینه در ایران ، در بین بیمارانی با بازه سنی ۱۵ تا ۸۵ سال که بیشترین تعداد بیماران متعلق به بازه سنی ۴۰ تا ۴۹ سال بوده ، میزان بروز سرطان سینه در زنان بیش تر از ۳۰ سال در ایران ۲۲ مورد در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر و میزان شیوع این بیماری در همین جامعه ۱۲۰ مورد در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر گزارش شده است [18] .

#### ۱-۴-۲- نقش استروژن در سرطان سینه :

در کنار سن و ژنتیک ، بیشترین عوامل خطر برای سرطان سینه ، به افزایش میزان استروژن در بدن و قرار گرفتن در معرض آن (چه به صورت اندوژن و چه به صورت اگزوژن) مرتبط است [19] .

عوامل خطر سرطان سینه که به استروژن مرتبط هستند طی بیوپسی های انجام شده ، افزایش دانسیته سینه و همچنین افزایش تراکم استخوان را نشان می دهند [20].

هورمون تراپی با استروژن و پروژسترون طی یک دوره ۵/۲ ساله در WHI مورد مطالعه قرار گرفت که در گروه دریافت کننده استروژن و پروژسترون نسبت به گروهی که دارونما دریافت کرده بود ، با افزایش بروز سرطان سینه و همچنین با افزایش مرگ در اثر سرطان سینه روبرو شدند [21]. این افزایش ریسک سرطان سینه و مرگ در اثر آن ، در یک پیگیری ۱۱ ساله ، به طور میانگین همچنان ادامه پیدا کرد [22].

#### ۱-۵- سلول های MCF-7 :

MCF-7 یک لاین سلولی از سرطان سینه است که در سال ۱۹۷۰ از یک زن ۷۹ ساله ی قزاقستانی جدا شده است . MCF-7 مخفف Michigan Cancer Foundation 7 است که به موسسه ای در دیترویت ایالات متحده امریکا بر میگردد که در آن دکتر هربرت سول و همکارانش برای اولین بار این لاین سلولی را جدا کردند [23].

قبل از جداسازی و کشف MCF-7 ، امکان تعیین یک لاین سلولی از سرطان سینه که قادر به زنده ماندن بیشتر از چند ماه باشد برای محققان سرطان وجود نداشت [24].

# ۱-۵-۱- مشخصات و ویژگی های MCF-7 :

## جدول ۱-۲ - مشخصات و ویژگی های MCF-7 :

Invasive Ductal Carcinoma	تومور اولیه
Pleural Effusion	منشا سلولی
دارد	گیرنده استروژنی
دارد	پاسخ تکثیر شونده در معرض استروژن
دارد	گیرنده پروژسترونی
ندارد	ژن هم افزایی ERBB2 (با بیان HER2/neu pro)
فقط همراه با مکمل استروژنی دارد	قابلیت ایجاد تومور در موش
Luminal Epithelial	فنوتیپ سلولی

این لاین سلولی خصوصیات متعددی از اپیتلیوم تمایز یافته ی پستان دارد که شامل :

۱. توانایی ایجاد استرادیول با گیرنده های سیتوپلاسمی استروژن

۲. قابلیت ایجاد توده

TNF- $\alpha$  از رشد و تکثیر سلول های MCF-7 جلوگیری می کند و درمان با آنتی استروژن ها می تواند ترشح پروتئین های متصل شونده IGF را تنظیم کند و از رشد سلول بکاهد .

رده سلولی MCF7 از جمله رده سلولی سرطان سینه است که به استروژن حساس است و استروژن رسپتور آلفا (ER- $\alpha$ ) و استروژن رسپتور بتا (ER- $\beta$ ) را بیان می کند. مجاورت سلول های MCF7 با مواد شیمیایی گیاهی بطور موثری از پیشرفت سیکل سلولی که با استروژن تحریک شده و توسط ۱۷-بتا استرادیول القاء شده است را بلوکه می کند. بیشتر سرطان های سینه استروژن رسپتور آلفا را بیان می کنند و استروژن پروليفراسیون سلولهای اپیتلیال پستان را القاء می کند [23,25-29].

#### ۱-۶- سرده *Artemisia* :

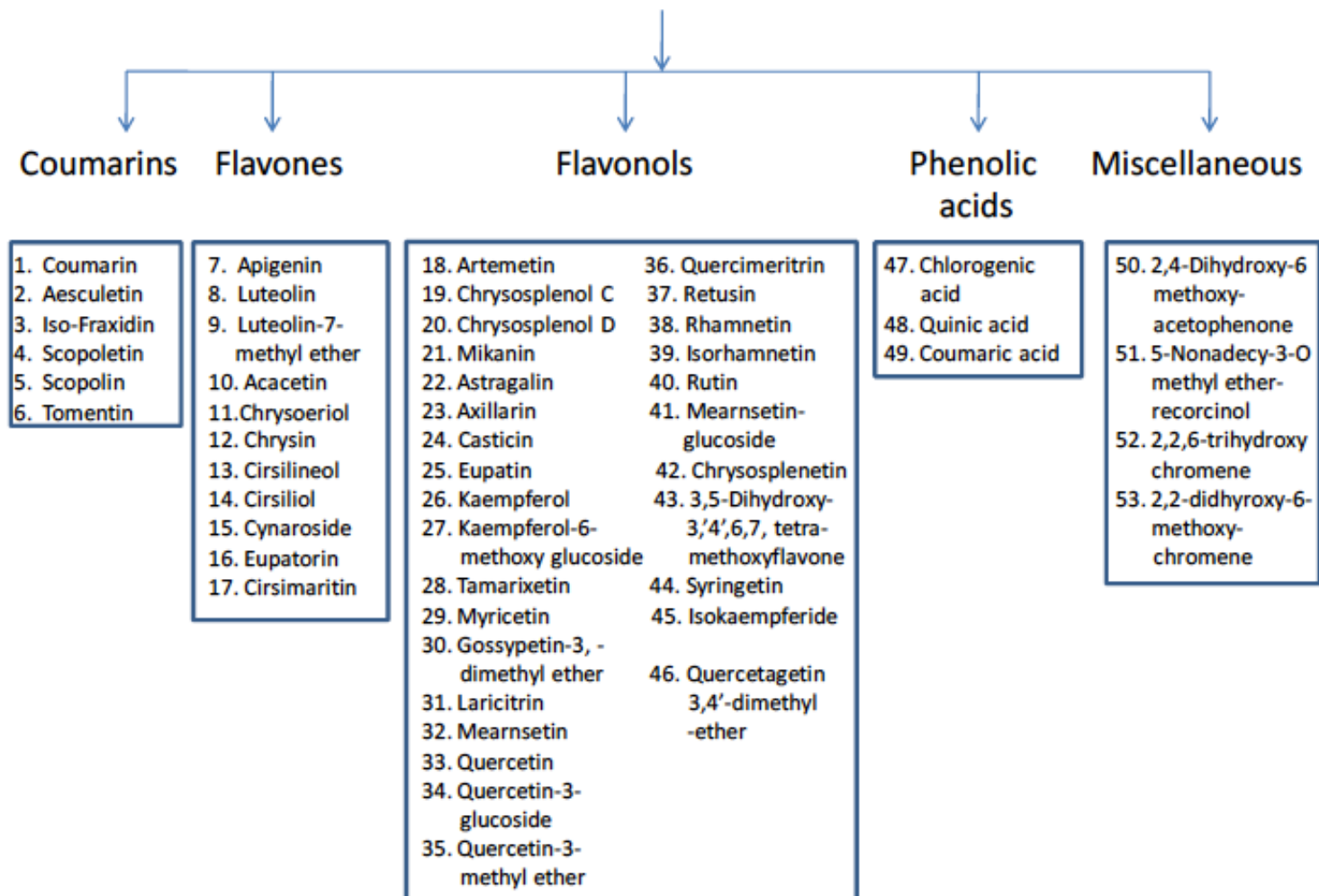
*Artemisia* از خانواده *Asteraceae* ، روزهای کمی از سال رشد می کند . ما در این گروه گیاه *Artemisia annua* را داریم که ساقه ی آن قهوه ای یا بنفش - قهوه ای است . خود گیاه پرز ندارد و بصورت طبیعی ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی متر رشد می کند ولی در کشت بصورت گلخانه ای گیاه ، امکان رشد آن تا ۲۰۰ سانتی متر وجود دارد . برگ گیاه طولی در حدود ۳ تا ۵ سانتی متر دارد و توسط شیارهای عمیق به ۲ یا ۳ بخش تقسیم می شود [30].

#### ۱-۶-۱- ترکیبات آنتی اکسیدانی :

مطالعات اخیر نشان می دهد که *Aretnisia Annua* یکی از ۴ گیاه دارویی با بالاترین میزان ظرفیت جذب رادیکال های آزاد اکسیژن ( ORAC ) است [31].

این گیاه ظرفیت تولید میزان بالایی از ترکیبات فنولی را داراست که نتیجه ی آن فعالیت بالای آنتی اکسیدانی گیاه است . ۵ گروه اصلی ( coumarins, flavones, flavonols, phenolic acids and miscellaneous ) شامل بیش تر از ۵۰ ترکیب فنولی مختلف هستند که طی آنالیز *annua* شناخته شده اند [32].

### Phenolics from *Artemisia annua*



فلاوونوئید ها عموماً به علت خواص اکسیداسیون و احیا که در تاخیر یا ممانعت از شروع یا انتشار زنجیره های

واکنشی اکسیداسیون نقش دارند ، شناخته می شوند [32] .



اگر چه اثر سودمند این ترکیبات فنولی برای شمار زیادی از بیماری ها شده ، در مطالعات مختلفی که اثرات سودمند ترکیبات فلاوونوئیدی تولید شده توسط این گیاه را نشان می دهد ، بیان شده که یک نسبت معکوس بین استفاده از ترکیبات ذکر شده و بیماری های قلبی عروقی ، سرطان و انگلی ( مثل مالاریا ) وجود دارد [32] .

#### ۱-۶-۲- فلاوونوئیدها :

در ۲۰ سال اخیر محققان روی فعالیت *annua* علیه مالاریا تمرکز کرده اند و مطالعات کمتری در مورد ارتباط بین فلاوونوئیدها و سرطان انجام شده است . بر خلاف آن ، مطالعات اخیر نشان داده اند که ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در برگ *annua* با سرکوب آنزیم CYP-450 که مسئول اصلاح متابولیسم و جذب Artemisinin در بدن است ، ارتباط دارد [32] .

#### ۱-۶-۲-۱- ویژگی های ضد سرطان فلاوونوئیدها :

مطالعات متعددی نشان داده است که درمان با نوشیدنی هایی که ترکیبات بالای فلاوونوئیدی دارند مثل چای *annua* ممکن است به جلوگیری ، تاخیر در رشد و درمان سرطان کمک کند . تحقیقات اخیر ، اثرات فلاوونوئیدی را با آنزیم های مختلف درگیر در متابولیسم دارویی و پروسه های شیمیایی ایجاد کننده ی سرطان مرتبط کرده که این موضوع به قابلیت درمانی آن باز می گردد [33] .

تحقیقات زیادی با آنالیز فلاوونوئید ها مثل فلاوون و فلاوونول ها ، اثرات ضد سرطان را نشان می دهد که به طور کلی ، مشخص شده که ترکیبات خاص فلاوونوئیدی می توانند از تکثیر سلول های سرطانی خاصی جلوگیری کنند ، بعلاوه اینکه باعث القای آپوپتوز سلولی می شوند [32] .

فعالیت ضد سرطانی annua تایید شده است زیرا حاوی یک گروه اندروپروکسید است و بعلت اثر متقابل با کمپلکس آهن فعالیت ضد سرطانی دارد [34] . در خون ، مشتقات Artemisinin به خوبی آپوپتوز را به سلول های سرطانی القا می کنند [35] .

#### ۱-۶-۳- ترخون گونه دیگری از سرده Artemisia :

ترخون با نام انگلیسی Tarragon و نام علمی Artemisia dracunculus یک گیاه همیشگی از خانواده asteraceae است که تاریخچه وسیعی در آشپزی سنتی دارد . همچنین این گیاه طیف وسیعی از فواید بهداشتی دارد که به طور گسترده ای به عنوان گیاه دارویی مصرف می شود [36] .

#### ۱-۶-۳-۱- ریخت شناسی گیاه :

Artemisia dracunculus یک گیاه همیشگی جنگلی با ارتفاعی حدود ۴۰ تا ۱۵۰ سانتی متر است . ساقه هوایی گیاه از یک ریزوم ( ساقه های زیر زمینی ریشه مانند ) ضخیم افقی ، به صورت دسته ای یا به تنهایی رشد می کنند . برگ های گیاه بین ۱/۲ تا ۸ سانتی متر طول و ۱ تا ۶ میلی متر قطر عرضی دارند . برگ های گیاه به

وسیله شکاف های عمیق به دو یا سه قسمت تقسیم می شوند . گیاه آرایش خوشه ای با گل های متعدد دارد ، گلچه های بیرونی قسمت مادگی و قابل باروری گیاه و گلچه های مرکزی نازا و تخمدان هایشان بی ثمر هستند. تخم گیاه تقریباً ۱/۵ میلی متر طول دارد [37-39] .

#### ۱-۶-۳-۲- دامنه انتشار :

منشا اصلی ترخون در دره های آبرفتی روسیه و نواحی غربی آمریکای شمالی بوده است اما اکنون پرورش آن در تمام نقاط ایران معمول است . جنس *Artemisia* بیش از ۳۰۰ گونه دارد که در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری آسیا انتشار دارند . اعضاء جنس *Artemisia* جزء گیاهان آروماتیک شناخته شده اند [37-39] .

#### ۱-۶-۳-۳- ترکیبات فعال از نظر بیولوژیک :

مهم ترین گروه متابولیت های ثانویه در روغن ترخون که از نظر بیولوژیکی فعال هستند کومارین ها ، فلاوونوئیدها و فنولیک اسیدها می باشند . بیشتر تحقیقات به ترکیبات روغن ترخون ، رشد و تنوع آن پرداخته اند [40-42] . تعدادی از مقالات نیز مشتقات پلی استیلن و فلاوونوئیدها را بررسی کرده اند ، علاوه بر آن سسکوترپنوئیدها ویتامین ها و مواد دباغی نیز گزارش شده اند [43,44] .

مواد بیواکتیو ترخون در جدول (۴-۱) و ساختار ترکیبات در شکل (۱-۱)

جدول (۴-۱) - ترکیبات فعال از نظر بیولوژیکی ترخون

Class	Compound
Flavonoids (Flavones, Flavanones, Dihydroflavanols, Chalcones)	5,6,7,8, 40 -pentahydroxymethoflavone estragoniside 7-O-β-D-glycopyranoside 5,7-dihydroxyflavavone pinocembrin 7-O-β-D-glucopyranoside luteolin quercetin rutin kaempferol annangenin 5,7-dihydroxyflavone naringenin 3,5,40 -trihydroxy-7-methoxyflavanone 3,5,4 -trihydroxy-7,30-dimethoxyflavanone 20,40-dihydroxy-4-methoxydihydrochalcone davidigenin sakuranetin
Phenylpropanoids	chicoric acid hydroxybenzoic acid (E)-2-hydroxy-4-methoxycinnamic chlorogenic acid caffeic acid 5-O-caffeoylquinic acid 4,5-di-O-caffeoylquinic acid
chromones/coumarins	herniarine (-)-(R)-20-methoxydihydro-artemidin (+)-(S,R)-epoxyartemidin dracumerin (+)-(R)-(E)-30-hydroxyartemidin capillarin isovalerate 7,8-methylenedioxy-6-methoxycoumarin γ,γ-dimethylallyl ether of esculetin scopoletin scoparone daphnetin methylene ether daphnetin 7-methyl ether artemidiol 4-hydroxycoumarin artemidin artemidinal artemidinol esculin capillarin 8-hydroxycapillarin 8-hydroxyartemidin 6-demethoxycapillarisin

Alkamides	Pellitorine neopellitorine A neopellitorine B
Benzodiazepines	delorazepame temazepame

روغن ترخون - ترکیبات روغن ترخون با تنوع معنی داری بسته به محل رشد گیاه مشخص می شود . مطالعات

روی محتوای روغن ترخون در طول زمان رشد گیاه نشان می دهد که در دو دوره از رشد گیاه ترکیبات فعال

گیاه بیش تر می باشد ؛ در شروع جوانه زدن و در آغاز دوره ی گل دهی [45].

محتوای روغن ترخون در بخش های هوایی گیاه معمولا ۰/۳۱ - ۰/۱۵ درصد و از ترکیبات غیرترپنوئیدی ؛

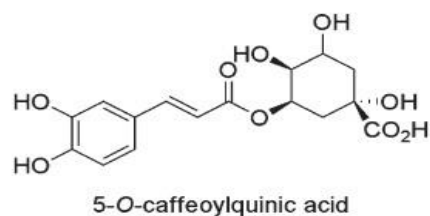
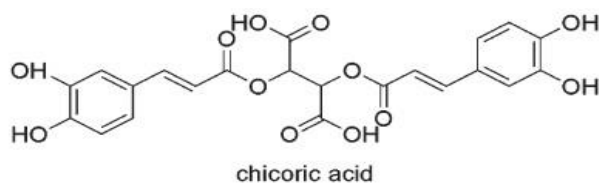
ترکیبات آروماتیک و استیلن ، مشتقات ایزو کومارین و اسیدهای چرب [40,42,46-52] . باید توجه داشت

که قسمت اعظم ترکیبات روغن ترخون بسته به محل رویش گیاه متفاوت است .

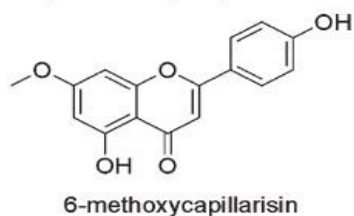
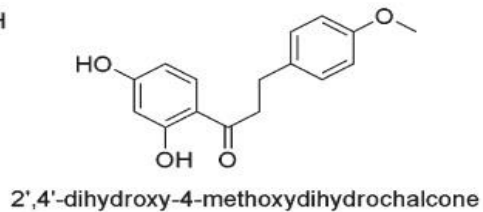
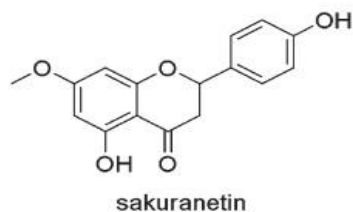
متیلگنول ( تا ۳۹ درصد ) ، استراگول ( تا ۸۲ درصد ) ، المیسین ( تا ۵۷ درصد ) و تریپینولن ( تا ۲۵ درصد ) به

عنوان جز غالب در ترخون هایی با مح رویش متفاوت گزارش شده اند [47-49] .

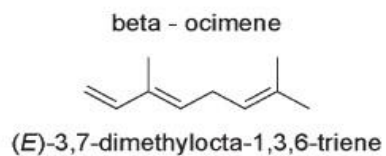
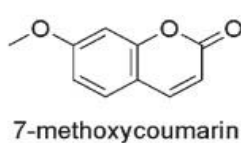
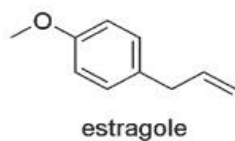
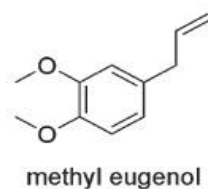
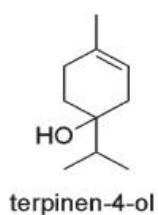
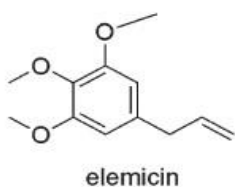
### Phenylpropanoids



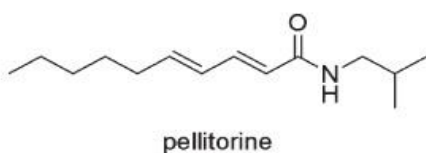
### Flavonoids and chalcones



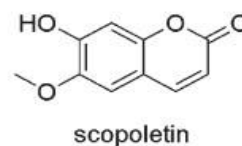
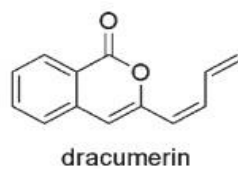
### Essential oil



### Alkamides



### Coumarins



کومارین - ترخون به طور معمول حاوی بیشتر از ۱ درصد کومارین است . بیش ترین مقدار آن در دوره ی مولد

گیاه است که ترکیب آن در این دوره ثابت می ماند . کومارین های کشف شده شامل موارد زیر است :

Herniarin ✓	8-hydroxy capillarin ✓
Coumarin ✓	Artemidin ✓
Esculetin ✓	8-hydroxy artemidin ✓
Esculin ✓	Capillarin ✓
[45,53-55] ... ✓	Artemidinol ✓

پراکسیداز و بازهای نیتروژن - ریشه ، ساقه ، برگ ها و گل گیاه حاوی آنزیم پراکسیداز است [45] . اگر چه

مکانیسم دقیق آن هنوز روشن نشده ولی پراکسیدازها در افزایش قدرت دفاعی گیاه در مقابل پاتوژن ها نقش

دارند . رابطه مستقیمی بین فعالیت پراکسیداز و محتوای ترکیبات فنولی گیاه کشف شده است . پراکسیداز توانایی

نشان دادن فعالیت پراکسیداز در  $\text{pH } 5/2$  و فعالیت اکسیداز در  $\text{pH } 7 - 8/5$  را دارد [45] . بعضی مطالعات از

مواد حاوی نیتروژن در ترخون و گروهی از سلول های بافتی آن که اثر مثبت بر گیرنده های بنزودیازپینی مغز

انسان دارند صحبت کرده اند [56] .

#### ۱-۶-۳-۴- ویژگی های گیاه از نظر داروسازی و فعالیت بیولوژیکی :

گفته می شود که عصاره و بعضی ترکیبات ترخون طیف وسیعی از ویژگی های مورد استفاده در داروسازی را

داراست :

✓ فعالیت آنتی باکتریال

✓ فعالیت ضد قارچی

✓ فعالیت ضد التهابی

✓ ویژگی های آنتی دیابتیک

✓ ویژگی های محافظت کننده کبدی

✓ ویژگی های محافظت کننده برای معده

✓ فعالیت ضد تشنجی

در کنار مطالعات *in vitro* تعدادی از مطالعات *in vivo* طیف گسترده ای از ویژگی های بهبود سلامت را نشان می دهد که از مهم ترین آنها فعالیت آنتی هیپرگلیسمیک است که در مدل های حیوانی به طور وسیعی بررسی شده است و نتایج خوبی حاصل شده است [57-61].

#### ۱-۶-۳-۵- فعالیت دارویی ترخون در محیط *in vivo* :

##### ❖ فعالیت ضد التهابی :

عصاره اتانولی ترخون فعالیت قابل توجه آنتی اگزوداتیو دارد . عصاره اتانولی خام ( ۷۰ و ۴۰ درصد ) ترخون ، ادم ناشی از آدرنالین و فورمالین را در *rat* ها تا ۸۰ درصد کاهش می دهد . عصاره اتانولی ۷۰ درصد توان فعالیت ضد التهابی قوی تری نسبت به فیل بوتازون نشان می دهد [62,63].

##### ❖ فعالیت محافظتی کبدی :



فعالیت محافظتی عصاره خام اتانولی ترخون برای کبد در مدل حیوانی که هپاتیت تحت حاد ناشی از تراکرومتان در rat بوده بررسی شده است. کاهش قابل توجهی در وسعت نکروز کبدی ( حداقل ۳۰ درصد ) در rat هایی که عصاره اتانولی ۷۰ درصد ترخون دریافت کرده بودند مشاهده شد. علاوه بر آن بعد از دریافت عصاره ترخون توسط rat ها، سلول های کبدی که هیچ گونه نشانه ای از دیستروپی نداشتند، در پارانسیم کبد افزایش یافت. به نظر می رسد که عصاره ترخون از طریق تقویت غشا و بهبود مکانیسم های جبرانی هپاتوسیت ها، باعث افزایش مقاومت هپاتوسیت ها نسبت به عوامل تهدید کننده می شود [62,63].

#### ❖ فعالیت آنتی هیپرگلیسمیک :

فعالیت آنتی هیپرگلیسمیک ترخون اولین بار توسط سوانسون فلت (Swanston-Flatt) توضیح داده شد که بیان کرد ترخون پر خوری و پر نوشی را در موش های دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین (streptozotocin) به طور قابل توجهی کاهش می دهد و به همین نسبت کاهش وزن را بهبود می بخشد [64]. جالب اینکه بیان کرد که درمان میزان گلوکز پلاسما و انسولین را به طور قابل توجهی تغییر نمی دهد در حالیکه توانایی ترخون در کاهش میزان گلوکز پلاسما در تعدادی از مطالعات مختلف in vivo و in vitro نشان داده شده است [44,60,65,66].

مطالعات in vivo نشان میدهد که ترخون در مدل های با گلوکز با منشا خارجی (OGTT) و هیپرگلیسمی ناشی از آدرنالین و همینطور دیابت ناشی از توکسین ( مثل دیابت ناشی از آلوکسان و یا استرپتوزوتوسین ) خواص آنتی هیپر گلیسمیک دارد [59,63].

همچنین روی عصاره اتانولی ترخون (Taralin) بصورت گسترده ای مطالعه شده که مقادیر پایین تر گلوکز پلاسما را در موش های با دیابت ژنتیکی (KK-Ay) نشان می دهد . مطالعات *in vitro* نشان داده که تارالین باعث می شود که برداشت قند در عضلات افزایش پیدا کند و فعالیت کینازهای داخل سلولی که انسولین روی آنها اثر دارد را بهبود می بخشد [61].

❖ **فعالیت هیپولیپیدمیک** – دیابت با اختلال متابولیسم همه مواد شامل کربوهیدرات ها ، چربی ( دیسلیپیدمی ، آترواسکلروز و چاقی ) و پروتئین ( برتری کاتابولیسم بر سنتز ) و همینطور مواد معدنی ، آب و نمک همراه است . فعال شدن پراکسیداسیون لیپیدها نقش اساسی در پاتورنز آترواسکلروز دارد . علاوه بر این افزایش در غلظت لیپوپروتئین های آتروژنیک و آسیب اندوتلیال عروقی نیز فاکتورهای مهمی هستند . بعلاوه هیپرلیپوپروتئینمی باعث اختلالات کبدی می شود ، در نتیجه فعالیت های هپاتوپروتکتیو ، هیپوگلیسمیک ، آنتی پلاکت و آنتی اکسیدانی ترخون امید بخش این است که از این گونه بعنوان ماده هیپولیپوپروتئینمیک و آنتی آترواسکلروتیک بتوان استفاده کرد [67].

❖ **فعالیت آنتی اکسیدانی** – توانایی عصاره ترخون در کاهش تجمع مالونیک آلدئید و سالیک اسید که توانایی جلوگیری از پراکسیداسیون چربی ها را مطرح می کند نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی ترخون است . علاوه بر این اجزا تشکیل دهنده ی روغن در محیط *in vitro* فعالیت متوسطی در پاکسازی رادیکال های آزاد نشان می دهند . متأسفانه مکانیسم دقیق این موضوع مشخص نیست و معمولاً به حساب فعالیت ترکیبات فنولی ترخون گذاشته می شود ، بنابراین احساس می شود نیاز اساسی جهت پرداختن به فعالیت جز به جز ترکیبات فعال این گیاه در آزمایشات مجزا وجود دارد [63,68].

❖ **فعالیت آنتی هیپوکسمیک** – عصاره اتانولی خام ترخون در rat هایی که دچار هیپوکسی حاد ناشی از

فشار کم اکسیژن شده اند باعث افزایش زمان زنده ماندن و کاهش مورتالیتی آنها می شود که مؤیدی بر

فعالیت آنتی هیپوکسمیک ترخون است . جالب اینکه عصاره آبی ترخون چنین اثری ندارد [62].

❖ **تأثیر بر دستگاه گوارش :**

✓ **معده** – در مطالعات در محیط *in vitro* اثر محافظتی ترخون روی معده یکی از اصلی ترین اثرات

ترخون بیان شده است [62]. عصاره اتانولی ترخون بطور موثری از اثرات ایجاد کننده زخم توسط فنیل

بوتازون جلوگیری می کند علاوه بر این شمسوالدینوف (Shamsudinov) از توانایی عصاره آبی ترخون

در افزایش ترشح شیر معده گزارش داده است [63]. اگر چه ممکن است عصاره ترخون باعث افزایش

ترشح شیر معده با یک مکانیسم واکنشی شده ، غیر محتمل است که اثر حفاظتی عصاره ترخون با اثرات

پوششی با آنتی اسید همراه باشد و بیش ترین احتمال فعال کردن فاکتور های محافظتی ( مثل تولید

موسین و بی کربنات ) ، خاصیت جمع کنندگی یا فعالیت علیه هلیکوباکتر پیلوری است [69].

✓ **کبد** – شمسوالدینوف گزارش داده است که عصاره خشک ترخون باعث کاهش فعالیت ترانس آمینازهای

کبدی ( گاماگلوتامیا ترانسفراز ، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز ) در هیپاتیت تحت حاد

کبدی ناشی از تتراکلرومتان می شود [63]. در یک آزمایش مشابه توسط آگلارووا (Aglarova) تزریق

عصاره ترخون باعث کاهش تغییرات دیستروفیک هپاتوسیت ها و متعاقب آن کاهش سایز و وسعت

قسمت های نکروز شده کبدی شده است [62].

#### ۱-۶-۳-۶- عصاره ترخون :

اگرچه استراگول و متیلگنول بعنوان ترکیبات جدا ممکن است توکسیک باشد ولی آب و عصاره آبی-الکلی ترخون هیچ توکسیسیته ی حادی در حداکثر دوز تحمل شده که تا ۲۰۰ میلی لیتر به ازای هر ۱۰ کیلوگرم وزن بدن نشان نداده است [57,62]. ربینیکی (Ribnicky) بیان کرده است که عصاره ترخون در دوز ۱۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در جانداران فعالیت موتاژن ( ایجاد کننده موتاسیون ) دارد [58].

# **فصل دوم:**

## **بررسی متون**



اهمیت استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری ها و ممانعت از رشد باکتری ها ی پاتوژن به خوبی شناخته شده است . ولی با وجود تنوع بسیار زیادی که این نوع گیاهان چه در سطح جهانی و یا منطقه در کشور دارند و همچنین ظهور بیماری ها و عوامل بیماری زای جدید مطالعه و تحقیق در این مورد ادامه دارد . با صنعتی شدن جوامع بشری شمار مبتلایان به سرطان رشد چشمگیری داشته و استفاده از دارو های ضد سرطان در درمان بیماران مبتلا به سرطان کاربرد وسیعی پیدا کرده است [70]. پلی فنل ها انواعی از آنتی اکسیدان ها هستند که در جلوگیری از بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان نقش دارند . این ترکیبات بسیار متنوع هستند و اثرات متفاوت دارند. ترکیبات فنلی شامل ویتامین ها , رنگدانه ها و فلاونوئید ها , ویژگیهای ضد جهشی و در نتیجه ضد سرطانی و همچنین فعالیت کاهش قند خون را دارند [71] سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان ۴۰ تا ۴۴ ساله میباشد. این سرطان عامل سی درصد در صد تمام سرطان های زنان و بیست درصد مرگ و میر ناشی از سرطان می باشد . شیوع سرطان پستان در کشور های در حال توسعه در حال افزایش است و در بسیاری از نقاط دنیا به صورت شایع ترین بیماری بدخیم در بانوان در آمده است . به طوری که آمار جهانی نشانگر ابتلای سالانه یک و نیم میلیون نفر در سراسر جهان بوده و میزان مرگ و میر ناشی از آن سالانه ۵۰۲۰۰۰۰۰ گزارش کرده اند . سرطان پستان در ایران کمتر از نقاط دیگر آسیا بوده است . در حالی که در طی دهه های اخیر شیوع این سرطان در زنان ایرانی رشد بالایی داشته است که نگران کننده می باشد . علاوه بر آن در زنان ایرانی حداکثر سن ابتلا به سرطان پستان حدود یک دهه کمتر از زنان در کشورهای پیشرفته می باشد . شیمی درمانی یکی از مهم ترین روش های درمانی برای سرطان می باشد . اثرات جانبی یکی از ملاحظات عمده طب غربی برای ترکیبات ضد تومور می باشد . با وجود اینکه پزشکی گیاهی یک امتیاز قابل تحسین بر ترکیبات صناعی دارد برای آنکه آنها دارای عناصر طبیعی هستند و اثرات منفی کمتری دارند [72]. مطالعات اپیدمیولوژی پیشنهاد میکنند که مواد غذایی

غنی از میوه ها و سبزیجات بر روی سرطان های مختلف از جمله سرطان کلون اثر باز دارنده دارند [73]. امروزه یکی از بهترین آنتی اکسیدانهای طبیعی ، ترکیبات فنلی گیاهان می باشند [74]. آنتی اکسیدانهای پلی فنلی یک گروه ویژه از متابولیت های ثانویه را تشکیل می دهند که نقش مهمی در حفاظت بافت ها در مقابل اثرات اکسید کنندگی رادیکال های آزاد اکسیژن و سایر گونه های فعال ایفا میکنند ، به طوری که از بروز بیماری های متعددی از جمله بیماری های التهابی ، سرطان ، دیابت ، سکته قلبی ، آلزایمر و پارکینسون جلوگیری می نماید [75,76].

مطالعات اخیر نشان می دهد که خانواده *Aretnmisia* یکی از خانواده های گیاهی با بالاترین میزان ظرفیت جذب رادیکال های آزاد اکسیژن ( ORAC ) است [31].

محصولات ترخون طیف گسترده ای از ترکیبات گیاهی شامل مونوترپنوئیدها ، سسکوئی ترپنوئیدها ، فلاوونوئیدها ، کومارین ها ، ایزوکومارین ها ، پلی استیلن و آلکانوئید ها را دارا می باشند و منبع مناسبی برای استفاده های دارویی برای درمان و یا جلوگیری از پیشرفت سرطان می توانند باشند . تحقیقاتی که تا کنون روی اثرات ضد سرطانی محصولات خانواده *Artemisia* و به ویژه ترخون انجام شده و همچنین تحقیقاتی با هدف متفاوت ولی مرتبط انجام شده در زیر آورده شده است [77,78]:

در سال ۲۰۰۴ ریبینیکی و همکاران روی اثرات توکسیک عصاره اتانولی ترخون در استفاده به عنوان مکمل غذایی در محیط *in vivo* در موش مطالعه کردند . نتایج هیچ فعالیت موتاژنی را نشان نداد و *rat* های مورد مطالعه تحمل خوبی را به دوز 1000 mg/kg/day چه در فاز حاد و چه در فاز تحت حاد نشان دادند [58].



در سال ۲۰۰۵ کردعلی و همکاران روی ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی روغن ترخون و فعالیت آنتی باکتریال و ضد قارچی ۵ گونه از خانواده *Artemisia* از جمله ترخون که از ترکیه جمع آوری شدند کار کردند که به طور عمومی یک اثر آنتی باکتریال و ضد قارچی در تمام گونه ها مشاهده شد . اثر آنتی اکسیدانی نیز به خصوص در ترخون مشاهده شد [48].

در سال ۲۰۰۸ لوپز و همکاران روی ترکیبات ،اثرات آنتی میکروبیال و آنتی اکسیدانی روغن ۵ گونه از خانواده *Artemisia* از جمله ترخون کار کردند که علاوه بر اثرات آنتی میکروبیال اعضای این خانواده بر روی باکتری ها از جمله *E.coli* ، استاف اورئوس ، استاف اپیدرمیدیس و سایر میکروارگانیسم ها مثل تعدادی از آغازی ها و غیره اثرات آنتی اکسیدانی روغن این گیاهان از جمله ترخون مشاهده شد [47].

در سال ۲۰۰۹ سید احمد امامی و همکارانش فعالیت ضد سرطانی ۵ گونه از جنس *Artemisia* را روی رده سلولی Hep2 در سرطان حنجره و HepG2 در هپاتوسیت کارسینوما را بررسی کردند . غلظت های مختلف از عصاره اتانولی هر نمونه حاضر شد و با روش کمی MTT اثر سیتوتوکسیک این نمونه ها بررسی شد . و نتایج نشان داد که سمیت به غلظت و زمان وابسته است و همچنین اثر سمیت بر روی سلولهای HepG2 در مقایسه با سلولهای Hep2 بیشتر بود [79].

در سال ۲۰۱۲ غلامرضا اصغری و محمد جلالی فعالیت آنتی باکتریال و ترکیب شیمیایی روغن *Artemisia aucheri* را مورد مطالعه قرار دادند و اثرات ضد میکروبی علیه *E.Coli*، استاف اورئوس و لیستریا مونوسیتوزن بررسی شد و ترکیباتی همچون ترپن ها در روغن حاصل از بخشهای هوایی گیاه یافت شد. در نهایت به این نتیجه رسیدند که تنوع زیاد ترکیبات گیاه باعث تنوع زیادی در فعالیت آنتی باکتریال آن می شود [80].

در سال ۲۰۱۲ شهید اقبال و عمر یونس روی ترکیبات شیمیایی و آنتی اکسیدان برگها و عصاره گونه *Artemisia annua L.* مطالعاتی انجام دادند و نتایج حاصل حاکی از آن بود که حلالهای مورد استفاده جهت عصاره گیری بر روی کارایی عصاره موثر هستند و استفاده از متانول توصیه شده است [81].

در سال ۲۰۱۳ بابک گردانیان و همکارانش سمیت سلولی عصاره متانولی گیاه ترخون (درمنه دشتی) بر رده سلولی سرطان سینه انسانی *MCF7* را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه اثر عصاره متانولی قسمت های مختلف گیاه جمع آوری شده از استان های اصفهان و خراسان در غلظت های مختلف به روش *MTT* بررسی شد که نتایج نشان داد گیاه منطقه خراسان سمیت سلولی بیشتری نسبت به گیاه منطقه اصفهان دارد [82].

در سال ۲۰۱۳ کلانتری و همکاران اثر توکیسک و موتازن عصاره ترخون را بررسی کردند . مطالعه نشان داد که رابطه ی مستقیمی بین میزان (دوز) عصاره ترخون و میزان موتازنیسیته ، فعالیت آنزیم های کبدی در سرم و هیستوپاتولوژی کبدی وجود دارد که امکان وجود متیل کاویکول و سایر ترکیبات رنوتوکسیک را در ترخون

نوضیح داد . از این رو نتایج این مطالعه یک راهنمای ابتدایی جهت ارزیابی ریسک استفاده از ترخون در رژیم غذایی و خصوصا در صنایع دارویی بود [83].

در سال ۲۰۱۳ Padma و همکارانش فعالیت ضد سرطانی گونه *Artemisia vulgaris* روی سلولهای هپاتوسلولار کارسینوما را بررسی کردند که هدف تحقیق استفاده از عصاره متانولی برگ گیاه در محیط *in vitro* در برابر سلول های HepG2 هپاتوسلولار کارسینوما و استفاده از اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه و اثر سینرژیک همراه کموتراپی بوده است . دوز تعیین شده با روش MTT حدود ۰/۱ میلی گرم تخمین زده شد . تعیین توکسیسیته با استفاده از LDH نشان داد که عصاره گیاه علیه سلول های هپاتوسلولار کارسینوما اثر بخش است که با روش های staining هم تایید شد و نتیجه گیری شد که برگ این گیاه پتانسیل استفاده به عنوان ماده کموتراپیک را دارد [84].

در سال ۲۰۱۴ نوری و همکاران در مورد اثر عصاره اتانولی ترخون روی عملکرد و پاتولوژی کلیه ی Rat ها مطالعه کردند که نتایج نشان داد که عصاره اتانولی گیاه باعث تغییرات هیستولوژیک مثل آتروفی گلومرول ، احتقان سلول های التهابی در کلیه و دژنراسیون توبول های کلیوی می شود [85].



# **فصل سوم:**

## **مواد و روش ها**



## روش اجرا و طراحی تحقیق

نمونه های گیاهی جمع آوری شد و از هر کدام نمونه های هرباریومی تهیه گردید و سپس مورد شناسایی قرار گرفت. ما بقی نمونه ها برای شناسایی آکالوئید ، فلاونوئید و آزمایشات ضد سرطانی آماده شد.

### ۳-۱- آماده سازی عصاره اتانولی گیاه :

در این تحقیق از اتانول ۷۰ درجه و روش پرکولا سیون استفاده شد . بدین ترتیب که پنجاه گرم از پودر نمونه های گیاهی مورد نظر را داخل دکانتور ریخته سپس مرحله به مرحله به آن اتانول ۷۰ درجه اضافه نمودیم . برای اضافه کردن اتانول ابتدا آن را گرم و سپس به داخل دکانتور انتقال دادیم . افزودن اتانول را تا جایی ادامه دادیم که تمامی حجم گیاه داخل دکانتور خیس شد . برای عصاره گیری کامل بسته به نوع اندام (برگ ، ساقه ، ریشه) مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت زمان لازم بود . در این حالت پودر گیاه بهتر می تواند حلال را در خود جذب نماید تا حد اکثر مواد موثره در اتانول حل شود . پس از عصاره گیری عمل جدا سازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری انجام شد .

**رقیق سازی عصاره گیاهان :** هر یک از عصاره ها را با پروپیلن گلیکول رقیق کرده و علاوه بر عصاره خالص ، غلظت های ۲۵ ، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر از عصاره تهیه شد .

**شناسایی فلاونوئید ها :** یک گرم پودر گیاهی با ده میلی لیتر متانول به مدت ده دقیقه رفلاکس و صاف گردید و سپس با آب رقیق و با پترولیوم اتر دکامنه شد . فاز زیرین تغلیظ و در اتیل استات حل و جهت آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت .

**آزمایش ویل سون تابوک :** یک قسمت نمونه تهیه شده تغلیظ و ده قطره استن و اسید بوریک و اسید اگزالیک مجدداً تغلیظ و زیر لامپ UV قرار گرفت ظهور رنگ زرد که نشانه وجود فلاونوئید است مشاهده گردید . شناسایی آلکالوئید نیز با استفاده از معرف مایر شناسایی شد.

### ۳-۲- بررسی اثر ضد سرطانی عصاره ها :

بررسی خواص ضد سرطانی رقت های مختلف عصاره گیاه دارویی ترخون با استفاده از لاین سلولی و مطابق پروتکل زیر انجام شد رده سلولی MCF7 که مشتق از سرطان پستان است , از بانک سلولی انسیتوپاستور ایران تهیه شد . سلول ها در محیط High glucose DMEM حاوی ده درصد سرم جنین گاو , پنج درصد اسید های آمینه غیر ضروری و آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی دی اکسید کربن پنج درصد کشت شد . بررسی های مورد نیاز بر روی رده سلولی تازه از ازت مایع خارج شده انجام گردید.

### ۳-۳- سنجش توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو:

تعداد  $1 \times 10^4$  سلول در هر ول کشت شد و سپس پلیت ۲۴ ساعت به منظور اتصال سلول ها به کف پلیت در انکوباتور قرار گرفت . محیط رویی سلول ها خارج و محیط فاقد سرم حاوی غلظت های ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ترخون به هر چاهک اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل گردید . پس از مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت , تمام خانه های پلیت تریپسین زنی شد . سپس با اضافه کردن محیط کشت کامل , تریپسین غیر فعال شد و نسبت یک به یک تریپان بلو چهار درصد به هر خانه اضافه گردید و پلیت به مدت دو



دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. شمارش سلول ها با استفاده از لام نئوبار (در خانه های متعلق به شمارش گلبول های سفید) انجام گرفت. سلول های رنگ نگرفته به عنوان سلول های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، درصد حیات سلول ها در غلظت محاسبه شد.

$$100 \times \text{تعداد کل سلولها} / \text{تعداد سلولهای زنده} = \text{توانایی زیستی سلولها}$$

### ۳-۴-سنجش تترازولیوم (MTT):

اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده و تولید بلور های بنفش رنگ و نامحلول فورمازان است. هر چه تعداد سلول های زنده بیشتر باشد شدت رنگ تولید شده نیز بیشتر خواهد بود و بالعکس. برای انجام این تست تعداد ده هزار سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی خارج و هر چاهک دوبار توسط PBS شسته شد. سپس صد میکرو لیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ترخون به هر چاهک پلیت ۱ اضافه و پلیت به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شد. پس از آن محیط هر چاهک با صد میکرو لیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین گردید. به هر یک از چاهک ها ده میکرو لیتر محلول MTT با غلظت پنج میلی گرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان صد میکرو لیتر دی متیل سولفوکساید DMSO به هر یک از آنها اضافه و به مدت دو ساعت در دمای اتاق و در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک دیگر منتقل و جذب نوری OD هر

چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا (ELISA reader) قرائت و درصد حیات سلول ها در مورد هر غلظت محاسبه شد.

### ۳-۵- جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:

روش نمونه گیری به روش میدانی (جمع آوری گیاهان دارویی) بود. همچنین رده سلولی MCF7 که مشتق شده از سلولهای سرطان پستان موش می باشد جهت بررسی اثر متغیر مستقل (زمان و غلظت عصاره های گیاه ترخون) بر متغیر وابسته (سلولهای سرطانی مذکور) استفاده گردید. گروه های مورد مطالعه : گروه های سلولی مورد مطالعه شامل موارد زیر است.

گروه ۱: گروه کنترل منفی (سلول هایی که عصاره دریافت نکردند)

گروه ۲: گروه کنترل مثبت (سلول هایی که عصاره دریافت نکردند و در زمان انجام تست به آنها آنزیم سیس پلاتین افزوده گردید)

گروه ۳: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 25 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۴: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 50 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۵: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 100 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۶: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 150 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۷: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 25 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۸: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 50 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۹: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 100 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۱۰: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 150 mg/ml دریافت کردند)

تست های آزمایشگاهی مختلف ذکر شده برای تمامی گروه ها به صورت تریپلیکیت انجام شد .

### ۳-۶- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها :

داده های به دست آمده با برنامه نرم افزاری SPSS و به کمک آزمونهای آماری ANOVA در گروههای مورد مطالعه ، تعیین و داده ها از نظر آماری با تستهای پارامتری و ناپارامتری مورد بررسی قرار گرفت . داده های حاصل از آزمایشهای مربوط به تیمار سلولهای کشت شده در زمانها و غلظت های مختلف به دلیل توضیح نرمال با استفاده از آزمون پارامتری آنالیز واریانس (ANOVA) و سپس به کمک آزمونهای تعقیبی Post Hoc مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت . بر این اساس تمامی نتایج که در آنها  $p \text{ Value} < 0.05$  بود معنی دار تلقی گردید و نتایج با  $p \text{ Value} > 0.05$  معنی دار محسوب نگردید.



# **فصل چهارم:**

## **یافته ها و نتایج**



#### ۴-۱- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار ۲۴

ساعته عصاره گیاه ترخون:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۲۴ ساعته در جدول ۴-۱ مشاهده می شود. این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با گروه های با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ). همچنین گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ )، گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های با غلظت ۱۵۰ معنی دار نمی باشد ( $P > 0.05$ )، همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تنها نسبت به گروه با غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴-۱- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره گیاه ترخون

غلظت عصاره الکلی ترخون (تیمار ۲۴ ساعته)	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن [تعداد سلولهای زنده به تعداد کل سلولها] (توانایی زیستی سلولها)	90±7.5	13.56±5.67	84±7.3	89.6±9.4	62.9±8.8	75.33±9.7

۴-۲- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه ترخون:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۳۶ ساعته در جدول ۴-۲ مشاهده می شود این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه های با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی



لیتر نسبت به گروه با غلظت ۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار ( $P<0.05$ ) و نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ )، گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار ( $P<0.05$ ) و نسبت به گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ ) همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروه ها معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ).

جدول ۴-۲- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه ترخون

غلظت عصاره الکلی ترخون (تیمار ۳۶ ساعته)	گروه کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	گروه کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن [تعداد سلولهای زنده به تعداد کل سلولها] (توانایی زیستی سلولها)	94.54±6.5	13.56±5.67	80.82±6.29	78.60±9.9	63.48±8.4	72.2±17.57

#### ۴-۳- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست **MTT** مربوط به تیمار ۲۴

ساعته عصاره گیاه ترخون:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۲۴ ساعته در جدول ۴-۱ مشاهده می شود. این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با گروه های با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ). همچنین گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ )، گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های با غلظت ۱۵۰ معنی دار نمی باشد ( $P > 0.05$ )، همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تنها نسبت به گروه با غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره گیاه ترخون

غلظت عصاره الکلی ترخون (تیمار ۲۴ ساعته)	گروه کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	گروه کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن (توانایی زیستی سلولها)	92±3.9	15.56±4.98	87±5.2	87.2±5.1	69.9±6.1	73.67±6.3

۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶ ساعته عصاره گیاه ترخون:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۳۶ ساعته در جدول ۴-۲ مشاهده می شود این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه های با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار ( $P<0.05$ ) و نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ ) ، گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به

گروه با غلظت ۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار ( $P<0.05$ ) و نسبت به گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ ) همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروه ها معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ).

جدول ۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶ ساعته عصاره

گیاه ترخون

غلظت عصاره الکلی ترخون (تیمار ۳۶ ساعته)	گروه کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	گروه کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن (توانایی زیستی سلولها)	91.33±3.8	15.56±4.98	78.33±5.24	81.67±5.5	65.33±7.4	74.2±22

# **فصل پنچ:**

## **بحث و نتیجه گیری**



## ۵-۱- بحث مربوط به تغییرات غلظت در تاثیر عصاره گیاه ترخون بر سلول های سرطانی : MCF-7

بررسی سلول های سرطانی در دو تست MTT و تریپان بلو نشان داد که اگر بازه زمان را ثابت و غلظت ها را متغیر در نظر بگیریم. سلول های سرطانی با افزایش غلظت تا اندازه ای دچار آپتوز می شوند اما این مقدار آپتوز با افزایش میزان غلظت رو به افزایش مینهد به طوری که آمار نشان می دهد آپتوز سلولی در غلظت ۲۵ تفاوت معنی داری با گروه کنترل منفی ندارد و ما شاهد آپتوز سلولی در این غلظت نیستیم اما در غلظت های ۵۰ به بالا نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی داری را شاهد هستیم و آپتوز سلول های سرطانی رخ می دهد به طوریکه در غلظت ۵۰ نسبت به غلظت ۱۰۰ کمتر و در غلظت ۱۰۰ نسبت به غلظت ۱۵۰ کمتر اتفاق می افتد ، به بیانی دیگر هرچه غلظت عصاره ترخون افزایش یابد میزان آپتوز سلولی سلول های سرطانی هم افزایش می یابد تا جایی که در غلظت ۱۵۰ با بیشترین میزان آپتوز سلولی مواجه هستیم.

## ۵-۲- بحث مربوط به تغییرات زمان در تاثیر عصاره گیاه ترخون بر سلول های سرطانی : MCF-7

عصاره گیاه ترخون بر روی سلول های سرطانی در دو زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت آزمایش شد. به طوری که در این آزمایش در هر کدام از پلیت ها غلظت ها ثابت در نظر گرفته شد و زمان متغیر بود در این آزمایش در غلظت ۵۰ در زمان ۲۴ ساعت اثرگذاری مشاهده نشد ولی در زمان ۳۶ ساعت تفاوت معنی داری با گروه ۲۴ ساعته و همچنین گروه کنترل منفی داشته که نشان از وقوع آپوپتوز سلولی با افزایش زمان دارد. هم چنین در غلظت ۱۰۰ بین دو زمان ۲۴ و ۳۶ ساعته تفاوت معنی داری وجود داشت. در غلظت ۱۵۰ نیز تفاوت معنی داری بین دو زمان ۲۴ و ۳۶ ساعته وجود دارد و این یافته ها موکد این است که با افزایش زمان اثرگذاری عصاره نیز افزایش می یابد.

### ۵-۳- نتیجه گیری کلی:

نتیجه گیری می شود که عصاره اتانولی ترخون اثر آپوپتوتیک روی سلول های MCF-7 سرطان سینه دارد که این اثر آپوپتوتیک با افزایش غلظت و زمان نسبت مستقیم داشته و با افزایش غلظت و زمان سیتوتوکسیسیته گیاه علیه سلول های MCF-7 افزایش می یابد. بنابراین گیاه ترخون فعالیت ضد سرطانی علیه سرطان سینه دارد.

### ۵-۴- پیشنهادات:

با توجه به نتایج مطالعه حاضر موارد زیر را برای مطالعه بعدی پیشنهاد می کنم:



با توجه به اینکه غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر موثر نبود و باعث آپتوز سلول های سرطانی نشد و غلظت ۵۰ فقط در زمان ۳۶ ساعت اثر گذار بود پس در آزمایش های می توان غلظت های بیشتری را مورد مطالعه قرار داد تا غلظتی که بیشترین میزان سیتوتوکسیسیته را دارد مشخص شود.

زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت تفاوت چشمگیری نسبت به هم داشتند پس می توان متغیر زمان های بیشتری را با توجه به نیمه عمر عصاره در آزمایشات بعدی مد نظر قرار داد تا بهترین زمان برای تاثیر عصاره گیاه مشخص شود.



# **فصل شش:**

## **منابع**



۶-۱- منابع فارسی :

ندارد

۶-۲- منابع انگلیسی :

#### References:

1. Globocan 2008. Fast Stats. Most frequent cancers: both sexes. <file://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#BOTH> (Accessed on January 08, 2013).
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013; 63:11.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61:69.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55:74.
5. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. J Natl Cancer Inst 2011; 103:714.
6. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med 2007; 356:1670.
7. Breen N, A Cronin K, Meissner HI, et al. Reported drop in mammography: is this cause for concern? Cancer 2007; 109:2405.
8. Glass AG, Lacey JV Jr, Carreon JD, Hoover RN. Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy,

screening mammography, and estrogen receptor status. J Natl Cancer Inst 2007; 99:1152.

9. Robbins AS, Clarke CA. Regional changes in hormone therapy use and breast cancer incidence in California from 2001 to 2004. J Clin Oncol 2007; 25:3437.

10. Chlebowski RT, Kuller LH, Prentice RL, et al. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. N Engl J Med 2009; 360:573.

11. Marshall SF, Clarke CA, Deapen D, et al. Recent breast cancer incidence trends according to hormone therapy use: the California Teachers Study cohort. Breast Cancer Res 2010; 12:R4.

12. Goya M. Iranian Annual Cancer Registration Report 2003. Ministry of Health and Medical Education, Health Deputy, Center for Disease Control and Prevention. March 2005.

13. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahn AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5:24–27.

14. Mohagheghi MA, Mousavi Jarrahi AR, Mortazavi H, et al. Final report of National Cancer Registry modeling in Tehran. Tehran, Shahid Beheshti, and Iran universities of Health and medical services Cancer Institute, and Ministry of Health report 2002; 12:107–116.

15. Naghavi M. Mortality views in 18 Provinces of Iran 2001. Ministry of Health, Deputy to Health Directory, Research and development office, 2003;75.

16. Cady B. Breast cancer in the third millennium. Breast J 2000;6:280 –87.

17. Harirchi I, Ghaem-Maghami F, Karbakhsh M, Moghimi R, Mazaheri H. Patient delay in women presenting with advanced breast Cancer, a study from Iran. *Public Health* 2005; 119:885 – 91.
18. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
19. Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 1995; 346:883.
20. Zhang Y, Kiel DP, Kreger BE, et al. Bone mass and the risk of breast cancer among postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 336:611.
21. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003; 289:3243.
22. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 2010; 304:1684.
23. Soule, HD; Vazquez J; Long A; Albert S; Brennan M. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". *Journal of the National Cancer Institute*. 51 (5): 1409–1416.
24. Glodek, Cass, Ph.D., "A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement," 1990, page 68, Michigan Cancer Foundation, Detroit.
25. Levenson, AS; Jordan VC. (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line". *Cancer Research*. 57 (15): 3071–3078.

26. Lacroix, M; Leclercq G. (2004). "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update". *Breast Research and Treatment*. 83 (3): 249–289.
27. Ross, DT; Perou CM. (2001). "A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines". *Diseases Markers*. 17 (2): 99–109.
28. Charafe-Jauffret, E; Ginestier C; Monville F; Finetti P; Adelaide J; Cervera N; Fekairi S; Xerri L; Jacquemier J; Birnbaum D; Bertucci F. (2006). "Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers". *Oncogene*. 25 (15): 2273–2284.
29. Lacroix, M; Toillon RA; Leclercq G. (2006). "P53 and breast cancer, an update". *Endocrine-Related Cancer*. Bioscientifica. 13 (2): 293–325.
30. Anonymus. "Artemisia annua (sweet wormwood)". Royal Botanic Gardens. Retrieved November 25, 2015.
31. Brisibe, Ebiamadon Andi; Umoren, Umoren E.; Brisibe, Fraideh; Magalhães, Pedro M.; Ferreira, Jorge F. S.; Luthria, Devanand; Wu, Xianli; Prior, Ronald L. (2009-08-15). "Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L.". *Food Chemistry*. 115 (4): 1240–1246.
32. Ferreira, Jorge F. S.; Luthria, Devanand L.; Sasaki, Tomikazu; Heyerick, Arne (2010-04-29). "Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer". *Molecules*. 15 (5): 3135–3170.
33. Kale, Anup; Gawande, Sonia; Kotwal, Swati (2008-05-01). "Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level". *Phytotherapy Research*. 22 (5): 567–577



34. Efferth, Thomas; Benakis, Achille; Romero, Marta R.; Tomicic, Maja; Rauh, Rolf; Steinbach, Daniel; Häfer, Ralf; Stamminger, Thomas; Oesch, Franz (2004-10-01). "Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron". *Free Radical Biology and Medicine*. 37 (7): 998–1009.
35. Nakase, Ikuhiko; Gallis, Byron; Takatani-Nakase, Tomoka; Oh, Steve; Lacoste, Eric; Singh, Narendra P.; Goodlett, David R.; Tanaka, Seigo; Futaki, Shiroh (2009). "Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin–transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis". *Cancer Letters*. 274 (2): 290–298.
36. Obolskiy D, Pischel I, Feistel B, Glotov N, Heinrich M. *Artemisia dracunculus* L. (tarragon): a critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *J Agric Food Chem*. 2011 Nov 9;59(21):11367-84.
37. Cronquist, A.; Holmgren, A. H.; Holmgren, N. H. *Intermountain Flora: Vascular Plants of the Intermountain West, U.S.A. Vol. 5. Asterales*; New York Botanical Garden:New York, 1994; pp 496.
38. Hammond, C. R. A gallery of herbs: a botanical guide to some common and uncommon herbs. *Horticulture* 1976, 54, 52–63.
39. Stubbendieck, J.; Coffin, M. J.; Landholt, L. M. *Weeds of the Great Plains*, 3rd ed.; Nebraska Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry, in cooperation with the University of Nebraska: Lincoln, NE, 2003; pp 605.
40. Sayyah, M.; Nadjafnia, L.; Kamalinejad, M. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol*. 2004, 94, 283–287.
41. Stubbendieck, J.; Coffin, M. J.; Landholt, L. M. *Weeds of the Great Plains*, 3rd ed.; Nebraska Department of Agriculture, Bureau of Plant

Industry, in cooperation with the University of Nebraska: Lincoln, NE, 2003; pp 605.

42. Deans, S. G.; Svoboda, K. P. Antibacterial activity of French tarragon (*Artemisia dracunculus* Linn.) essential oil and its constituents during ontogeny. *J. Hortic. Sci.* 1988, 63, 503–508.

43. Greger, H. Aromatic acetylenes and dehydrofalcarinone derivatives within the *Artemisia dracunculus* group. *Phytochemistry* 1979, 18, 1319–1322.

44. Logendra, S.; Ribnicky, D. M.; Yang, H.; Poulev, A.; Ma, J.; Kennelly, E. J.; Raskin, I. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculus*. *Phytochemistry* 2006, 67, 1539–1546.

45. Aglarova, A. M.; Zilfikarov, I. N.; Severtseva, O. V. Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) [translated from Russian]. *Pharm. Chem. J. [Khim.-Farm. Zh.]* 2008, 42, 81–86.

46. Khodakov, G. V.; Kotikov, I. V.; Pankovetskii, V. N. Component composition of essential oil from *Artemisia abrotanum* and *A. dracunculus* [translated from Russian]. *Chem. Nat. Compds [Khim. Prirod. Soedin.]* 2009, 45, 905–908.

47. Lopes-Lutz, D.; Alviano, D. S.; Alviano, C. S.; Kolodziejczyk, P. P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 2008, 69, 1732–1738.

48. Kordali, S.; Kotan, R.; Mavi, A.; Cakir, A.; Ala, A.; Yildirim, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia*

santonicum, and *Artemisia spicigera*. J. Agric. Food Chem. 2005, 24, 9452–9458.

49. Meepagala, K. M.; Sturtz, G.; Wedge, D. E. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. J. Agric. Food. Chem. 2002, 24, 6989–6992.

50. Rutskih, I. B. Essential oil composition of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) collected in Siberia [in Russian]. Chem. Herbal Mater. [Khim. Prir. Mater.] 2000, 3, 65–76.

51. Pino, J. A.; Rosado, A.; Correa, M. T. Chemical composition of the essential oils of *Artemisia dracunculus* L. from Cuba. J. Essent. Oil Res. 1996, 8, 563–564.

52. Curini, M.; Epifano, F.; Genovese, S.; Tammara, F.; Menghini, L. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* “Piemontese” from Italy [translated from Russian]. Chem. Nat. Compd. [Khim. Prir. Soedin.] 2006, 42, 738–739.

53. Faini, F.; Labbe, C.; Salgado, I.; Coll, J. Coumarins of *Artemisia dracunculoides* and 3',6-dimethoxy-4',5,7-trihydroxyflavone in *A. arctica*. Phytochemistry 1970, 9, 891–894.

54. Engelmeier, D.; Hadacek, F.; Hofer, O.; Lutz-Kutschera, G.; Nagl, M.; Wurz, G.; Greger, H. Antifungal 3-butylisocoumarins from Asteraceae-Anthemideae. J. Nat. Prod. 2004, 67, 19–25.

55. Saadali, B.; Boriky, D.; Blaghen, M.; Vanhaelen, M.; Talbi, M. Alkamides from *Artemisia dracunculus*. Phytochemistry 2001, 58, 1083–1086.

56. Kavvadias, D.; Abou-Mandour, A. A.; Czygan, F. C.; Beckmann, H.; Sand, P.; Riederer, P.; Schreier, P. Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracunculus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their

endogenous formation in plant tissue. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 269, 290–295.

57. Supilnikova, A. V. Developing of Methods of Quantitative and Qualitative Analysis for Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). Ph.D. thesis, Samara, 2004.

58. Ribnicky, D. M.; Poulev, A.; O'Neal, J.; Wnorowski, G.; Malek, D. E.; Jäger, R.; Raskin, I. Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods. Food Chem. Toxicol. 2004, 42, 585-598.

59. Ribnicky, D. M.; Poulev, A.; Watford, M.; Cefalu, W. T.; Raskin, I. Antihyperglycemic activity of Tarralin<sup>TM</sup>, an ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L. Phytomedicine 2006, 13, 550–557.

60. Ribnicky, D. M.; Kuhn, P.; Poulev, A.; Logendra, S.; Zuberi, A.; Cefalu, W. T.; Raskin, I. Improved absorption and bioactivity of active compounds from an anti-diabetic extract of *Artemisia dracunculus* L. Int. J. Pharm. 2009, 370, 87–92.

61. Wang, Z. Q.; Ribnicky, D.; Zhang, X. H.; Raskin, I.; Yu, Y.; Cefalu, W. T. Bioactives of *Artemisia dracunculus* L enhance cellular insulin signaling in primary human skeletal muscle culture. Metab., Clin. Exp. 2008, 57, S58–64.

62. Aglarova, A. M. Comparative Analysis of Secondary Metabolites of *Artemisia dracunculus* L., Russian and French cultivars. Ph.D. thesis, Mahachkala, 2006.

63. Shamsudinov, Sh. N. Physiological Efficacy of Tarragon in Various Experimental Conditions. Ph.D. thesis, Dushanbe, 1994.

64. Swanston-Flatt, S. K.; Day, C.; Bailey, C. J.; Flatt, P. R. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. *Acta Diabetol.* 1989, 26, 51–55.
65. Govorko, D.; Logendra, S.; Wang, Y.; Esposito, D.; Komarnytsky, S.; Ribnicky, D.; Poulev, A.; Wang, Z.; Cefalu, W. T.; Raskin, I. Poly-phenolic compounds from *Artemisia dracunculus* L. inhibit PEPCK gene expression and gluconeogenesis in an H4IIE hepatoma cell line. *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.* 2007, 293, E1503–E1510.
66. Kheterpal, I.; Coleman, L.; Ku, G.; Wang, Z. Q.; Ribnicky, D.; Cefalu, W. T. Regulation of insulin action by an extract of *Artemisia dracunculus* L. in primary human skeletal muscle culture: a proteomics approach. *Phytother. Res.* 2010, 24, 1278–84.
67. Yazdanparast, R.; Saei, A. Effects of aqueous tarragon, *Artemisia dracunculus*, extract on lipid and coagulatory parameters in rats. *Biomed. Lett.* 1999, 59, 137–141.
68. Mamedov, N.; Grdner, Z.; Craker, L. E. Medicinal plants used in Central Asia for the treatment of selected skin conditions. *J. Herbs Spices Med. Plants* 2004, 11, 191–222.
69. Bloomer, R. J.; Canale, R. E.; Pischel, I. Effect of an aqueous Russian tarragon extract on glucose tolerance in response to an oral dextrose load in non-diabetic men. *Nutr. Diet. Suppl.* 2011, 3, 43–49.
70. Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream – a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine* 2003; 10 (Suppl. 04) 31-37.
71. Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Lucarini D, Maggi F. Antimicrobial activity of seven *Hypericum* entities from central Italy. *Planta Med* 2007; 73: 564-566.

72. Gibbons S, Ohlendorf B, Johnsen I. The genus *Hypericum* – a valuable resource of anti-Staphylococcal leads. *Fitoterapia* 2002; 73: 300-304.
73. Bystrov NS, Dobrynin VN, Kolosov MN, Chernov BK, Chervin II. [Structure of the chromophoric part of hyperforin]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1975; 225: 1327-1328.
74. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* 1999; 353: 2129.
75. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol* 2012; 88: 626-632.
76. Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NG, Bicsboer DD, Bey RF. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *J Med Plants Res* 2008; 2: 98-110.
77. Eisenman SW, Poulev A, Struwe L, Raskin I, Ribnicky DM. Qualitative variation of anti-diabetic compounds in different tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) cytotypes. *Fitoterapia* 2011; 82: 1062-74.
78. Engelmeier D, Hadacek F, Hofer O, Lutz-Kutschera G, Nagl M, Wurz G, et al. Antifungal 3-butyrisocoumarins from Asteraceae-Anthemideae. *J Nat Prod* 2004; 67:19-25.
79. Emami A, Vahdati-Mashhadian A, Vosough R, Oghazian MB. The Anticancer Activity of Five Species of *Artemisia* on Hep2 and HepG2 Cell Lines. *Pharmacologyonline* 2009; 3: 327-39.
80. Asghari G, Jalali M, Sadoughi E. Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Essential Oil from the Seeds of *Artemisia aucheri* Boiss. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2012;7:11-5.

81. Shahid Iqbal, Umer Younas , Kim Wei Chan , Muhammad Zia-Ul-Haq and Maznah Ismail. Chemical Composition of *Artemisia annua* L. Leaves and Antioxidant Potential of Extracts as a Function of Extraction Solvents. *Molecules* 2012, 17, 6020-6032.
82. Gordanian B, et al,. Evaluation of cytotoxicity of Sagebrush plain Extract on Human Breast Cancer MCF7 Cells. *Armaghane danesh,YUMSJ*,2013.
83. Kalantari H, Galehdari H, Zaree Z, Gesztelyi R, Varga B, Haines D, et al. Toxicological and mutagenic analysis of *Artemisia dracunculus* (tarragon) extract. *Food Chem Toxicol* 2013; 51: 26-32.
84. Sharmila K, Padma P. Anticancer Activity Of *Artemisia Vulgaris* On Hepatocellular Carcinoma (Hepg2) Cells. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. Vol 5, Suppl 3, 2013.
85. Noori A, Amjad L, Yazdani F. The effects of *Artemisia deserti* ethanolic extract on pathology and function of rat kidney. *Avicenna J Phytomed* 2014; 4: 371-6.







Qazvin University of Medical Sciences  
**Medical School**

**Reg No. 11105**

**Title:** Activity of Artemisia Druncunculus ethanol extract against breast camcer MCF-7 cells

**Supervisor:** Dr. Hossein Piri

**Advisors:** Dr. Hassan Jahani Hashemi

**Author:** Hamidreza Shahrah Najib.MD

**Abstract**

**Introduction:** Breast cancer is the most common cancer among women and in recent years has been growing in Iran. Chemical treatments have significant effects of cancer and the use of medicinal plants is one of the most constructive way that creates the least side effects. Tarragon herb Artemisia family due to high levels of antioxidant compounds suitable source for pharmaceutical use to treat and prevent the progression of cancer.

**Methods:** After collecting and drying the samples, extraction process was done by ethanol. MCF-7 cancer cell lines were incubated with different concentrations of ethanol extract for 24 and 36 hours and cell growth inhibition was determined using MTT and trypan blue assay. All the data were analyzed by SPSS software by one-way ANOVA followed by post hoc test TUKEY. In all analyses  $P < 0.05$  was considered significant.

**Results & Conclusion:** In testing MTT and trypan blue cell apoptosis was increased with increasing concentration and time. The ethanol extract of tarragon has anti-cancer activity against breast cancer cell line MCF-7 anti-cancer activity.

**Keywords:** Artemisia drucunculus , tarragon , breast cancer , MCF-7 cell line





**Qazvin University of Medical Sciences  
Medical School**

**Thesis for degree of medical doctor**

**Title:**

**Activity of Artemisia Druncunculus ethanol extract against  
breast camcer MCF-7 cells**

**Supervisor:**

**Dr. Hossein Piri**

**Advisors:**

**Dr. Hassan Jahani Hashemi**

**By:**

**Hamidreza Shahrah Najib .MD**

**Reg No. 11105**

**Year:  
2017**